



International

Journal of Human Sciences

ISSN:2458-9489

Volume 15 Issue 3 Year: 2018

The importance of genotoxicity tests in new drug development process

Selen Şen¹
Ayfer Beceren²
Hüseyin Aksoy³

Abstract

In the preclinic investigation period at the beginning of the drug development process, it is an obligation to subject candidate drugs to genotoxicity investigations. Genotoxicity data of drugs that are developed with these tests are demanded as a part of the security evaluation process by regulatory authorities in various countries. The demand of these laboring and costly data by regulatory authorities of various countries in different standards prevents potential candidate drugs from being marketed, interrupts the drug development process and causes unnecessary utilization of experimental materials in researches. Therefore, nowadays, it is generally accepted that the researches aimed at achieving these data are implemented with standardized approaches in the guidelines of international harmonisation organizations such as ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) and OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). In this review, it is aimed to provide current information about the various genotoxicity tests which are used commonly in the drug development process, in accordance with ICH, OECD guidelines and literature.

Keywords: Preclinical drug evaluation; genotoxicity tests; DNA damage; international guidelines.

[\(Extended English summary is at the end of this document\)](#)

Genotoksisite testlerinin yeni ilaç geliştirme sürecindeki önemi

Özet

İlaç geliştirme sürecinin başlangıcındaki prelinik araştırma döneminde, aday ilaçların genotoksisite testlerinden geçirilmesi bir zorunluluktur. Bu testlerle elde edilen genotoksisite verileri, çeşitli ülkelerdeki düzenleyici otoriteler tarafından güvenlik değerlendirme sürecinin bir parçası olarak istenmektedir. Elde edilmesi oldukça zahmetli ve maliyetli olan bu bilgilerin, farklı ülkelerin düzenleyici otoriteleri tarafından değişik standartlarda istenmesi, potansiyel ilaç adaylarının pazarlamasını engellemekte, ilaç geliştirme sürecini kesintiye uğratmakta ve araştırmalarda gereksiz yere deney materyali kullanımına neden olmaktadır. Bu bakımdan, günümüzde bu bilgileri elde etmeyi amaçlayan araştırmaların, ICH (İnsanda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması İçin Teknik Gerekliliklerin Uyumlandırılması Uluslararası Birliği) ve OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) gibi uluslararası harmonizasyon örgütlerinin kılavuzlarında standardize edilen yaklaşımlarla uygulanması genel kabul görmektedir. Bu derlemede, ilaç geliştirme sürecinde kullanılan genotoksisite testlerine ilişkin, ICH, OECD kılavuzları ve literatür ışığında güncel bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Prelinik ilaç değerlendirmesi; genotoksisite testleri; DNA hasarı; uluslararası kılavuzlar.

¹ Lecturer Dr., Sakarya University, Faculty of Health Sciences, scakirsoy@sakarya.edu.tr

² Assistant Professor, Marmara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, ayfertozan@hotmail.com

³ Professor, Sakarya University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, haksoy@sakarya.edu.tr

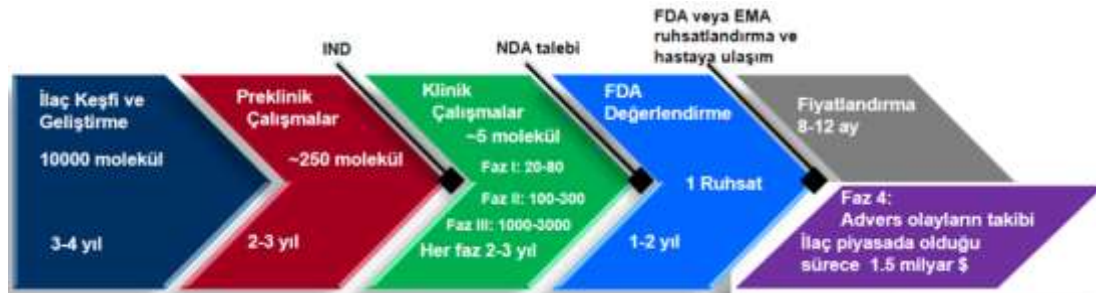
GİRİŞ

Günümüzde, klinik kullanımda olan bazı ilaçların tedavi edici etkileri iyileştirilmiş ve yan etkileri azaltılmış varyantlarına, bazı hastalıklar için farklı farmakolojik mekanizmalarla etki eden ilaçlara, yeni antimikrobiyalere ve kanser gibi henüz kesin tedavisi olmayan hastalıklarda kullanılabilecek etkili ilaçlara ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda, hem dünyada ve hem de ülkemizde, yeni ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalar her geçen gün artarak devam etmektedir. Yeni geliştirilen ilaçların anlamlı biyolojik aktivitelere sahip olduğunun belirlenmesi, bunların ilaç olarak önerilebilmesi için yeterli değildir. Kemoterapide hastaları sağlık riskleri oluşturmaktan tedavi etmek esastır ve ilaçların güvenlilikleri etkililiklerinden daha önemlidir. Bu bakımdan, ilaç olarak önerilmesi düşünülen aday moleküller, insanlar üzerinde kullanılmadan önce birer güvenlik testi niteliğinde olan kapsamlı toksisite araştırmalarından geçirilmektedir (Şen, 2018). Toksisiteyi kanıtlayan biyolojik bilginin elde edilmesi, ilaçlarda güvenlik değerlendirilmesinin en önemli amacıdır (Jena, Kaul & Ramarao, 2002).

Toksikolojik araştırmaların safhalarından biri olan genotoksisite testlerinde, aday ilaçların genetik materyal üzerindeki olası zararları hücre kültürleri ve deney hayvanları üzerinde değerlendirilmektedir. Bu amaçla, *in vivo* veya *in vitro* koşullarda uygulanabilen kısa süreli genotoksisite testlerinden yararlanılmaktadır. İlaç geliştirme sürecinin başlangıcında, genotoksisite testlerinin yapılması çok önemlidir. Çünkü, genotoksik etkili ajanların neden olduğu DNA hasarları insanlarda doğum defektleri, kanser, infertilite, kardiyovasküler, immün sistem ve dejeneratif hastalıklar gibi ciddi sağlık sorunlarına yol açabilmektedir (Bonassi ve ark, 1995; Hagmar ve ark, 1998; Cardoso ve ark, 2001; Şen, 2018).

YENİ İLAÇ GELİŞTİRME SÜRECİ

Doğal kaynaklardan elde edilen veya laboratuvarında sentezlenen aday moleküller, piyasaya sunulmadan önce sırasıyla prelinik ve klinik araştırma dönemlerinden geçirilir (Şekil 1). Prelinik araştırma dönemi; yeni ilaçların etkililikleri ile güvenliliklerinin sağlıklı canlı hayvanlar, izole organ preparatları ve hücre kültürleri üzerinde değerlendirildiği dönemdir (İskit, 2006)



IND: Investigational New Drug (Araştırılan Yeni İlaç); NDA (New Drug Application (Yeni İlaç Başvurusu); FDA (Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi); EMA (Avrupa İlaç Ajansı)

Şekil 1. İlaç geliştirme sürecinde prelinik ve klinik çalışmaların yeri

Prelinik dönemde yürütülen çalışmaların başında, insanlar için güvenli bileşikler bulmayı amaçlayan toksikolojik araştırmalar gelir. Toksikolojik araştırmalar, toksikokinetik çalışmaları ve toksisite testlerini içerir. Toksikokinetik çalışmalarda, incelenen maddenin organizmada emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı incelenir. Toksisite çalışmalarında ise akut, subakut, kronik, subkronik ve özel toksisite testleri yapılır. Özel toksisite testlerinde, aday ilaç moleküllerinin genotoksik, karsinojenik, teratojenik, transplesental, immunotoksik, nörotoksik ve üremeye ilgili toksik etkileri araştırılır (İskit, 2006; Brummelan, 2007)

Prelinik araştırma döneminden başarıyla geçen etken maddeler için, klinik araştırma dönemi başlatılır. Bu dönemde yapılan çalışmalar, insanlar üzerinde gerçekleştirilir ve dört fazda yapılır (Şekil 2.). Faz I çalışmaları, genellikle 20-80 sağlıklı gönüllü üzerinde güvenlik ve toksisite yönünden uygun doz aralığının saptanması amacıyla yapılır. Yaklaşık 2 yıl sürer. İlacın belirli bir

uygulama yolundan verilmesiyle, insanda maksimum tolere edilebilen doz belirlenir. Bu fazın amaçları, ilacın insanlardaki güvenliliğinin, doz sınırlayıcı istenmeyen etkilerinin, toksisitesinin, etki mekanizmasının, yapı aktivite ilişkisinin, farmakokinetik profilinin ve faz II çalışmalar için insanlara verilecek farmasötik şeklinin belirlenmesidir. Faz II çalışmaları, 100-300 hasta gönüllüde ve faz I'de saptanan tolere edilebilir doz ile 1-3 yıl devam eden çalışmalardır. Ana amacı, ilacın etkililiğini incelemektir. Diğer amaçları, ilacın hedef hasta grubundaki terapötik ve profilaktik dozunu belirlemektir (İskit, 2006; Ciociola ve ark, 2014).

Faz III çalışmalar, 1000-3000 hasta gönüllüde 3-4 yıl süren genellikle çok merkezli, çok uluslu, randomize, çift kör nitelikteki çalışmalardır. Bu çalışma süreci, ilacın klinik etkililiğinin ve yan etkilerinin daha geniş bir hasta popülasyonunda değerlendirilmesini sağlar. Faz III çalışmaları ile yeterli veriler elde edildikten sonra, ürünün ilaç olarak kullanılabilmesi için onay alınması gerekir. Her ülkenin yeni ilaçlarla ilgili yapılmış prelinik ve klinik araştırmaları onaylayacak ve ilaca ruhsat verecek resmi makamları vardır. Faz IV çalışmalar, ruhsat almış bir ilaç ile yapılan pazarlama sonrası izlem çalışmalarıdır ve ilaç piyasada olduğu süre boyunca devam eder. İlacı kullanmakta olan geniş hasta topluluklarının söz konusu olduğu bu çalışmaların ana amacı, uzun süreli güvenlilik verilerinin toplanmasıdır. Ayrıca, ilacın maliyet-yarar-risk oranlarının analiz edilmesi, etkililiğinin daha geniş hasta gruplarında gösterilmesi, ilaca bağlı gelişen ve ender rastlanan advers reaksiyonların ve ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi, ilaçla ilgili cevaplanmamış soruların cevaplanması ve aynı endikasyon için kullanılan ilaçlarla yeni ilacın karşılaştırılması da amaçlanır (İskit, 2006; Ciociola ve ark, 2014; Williams, 2016; Arodola 2017). Faz IV takibi sırasında ruhsat almış bir ilacın güvenlilik profilinde bir değişiklik bildirildiğinde risk değerlendirilir ve yönetilir. Bu değerlendirme, bir risk yönetim programının uygulanması, ilacın kısa ürün bilgisinde değişiklik, kara kutu uyarıları veya ilacın piyasadan çekilmesiyle yapılabilir (Williams, 2016; Dabrowska & Thaul, 2018).



Şekil 2. Prelinik Araştırma Döneminin Fazları

Prelinik ve Klinik Dönem Araştırmalarında Düzenleyici Otoritelerin ve Uluslararası Harmonizasyon Örgütlerinin Rolü

Yeni geliştirilen bir ilacın onay alabilmesi için, prelinik ve klinik araştırma dönemlerinde elde edilen aday moleküle ait kalite, güvenlilik ve etkililik ile ilgili ayrıntılı bilgilerin ilaçların geliştirildiği ülkelerdeki düzenleyici otoritelere sunulması gerekmektedir. Bu otoriteler: Amerika'da FDA (Gıda ve İlaç Dairesi), Avrupa Birliği'nde EMEA (Avrupa İlaç Ajansı) ve Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'na bağlı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'dur. Günümüzde, bu bilgileri elde etmek için yapılacak araştırmaların uluslararası geçerliliği olan ICH (İnsanda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması İçin Teknik Gerekliliklerin Uyumlandırılması Uluslararası Birliği) ve OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) gibi harmonizasyon örgütlerinin yayınladığı

kılavuzlarında standardize edilen ortak bir yaklaşımla uygulanması ve yorumlanması genel kabul görmektedir (Topaloğlu, 2014).

Üç büyük ilaç üreticisi olan Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Avrupa Birliği (AB) ve Japonya'nın düzenleyici makamları ile ilaç endüstrisi derneklerinin katılımıyla kurulmuş ICH, ilaç geliştirme sürecinde izlenmesi gereken yaklaşımla ilgili kalite, güvenilirlik, etkililik ve multidisipliner olmak üzere dört ana başlık altında toplanan çok sayıda uyumlandırılmış kılavuz yayınlamıştır. Güvenlilik başlığı altında toksikokinetik, akut/kronik toksisite, üreme toksisitesi, genotoksisite ve karsinojenite testlerine ilişkin bilgiler içeren kılavuzlar yer almaktadır (Topaloğlu, 2014). Bir diğer uluslararası harmonizasyon örgütü olan ve Türkiye'nin dahil olduğu 31 üye ülkeden oluşan OECD de, ilaçlar gibi kimyasal maddelerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılabilecek standardize edilmiş toksikolojik test metotlarını içeren kılavuzlar yayınlamıştır (Thybaud ve ark, 2014).

ICH ve OECD Kılavuzları Perspektifinden Preklinik Genotoksisite Testleri

Son yüzyılda dünya üzerindeki kimyasal kirlenme, sanayi devrimiyle gelişen teknolojinin en büyük yan etkisidir. Havanın, suyun, toprağın, gıdaların, sigaranın ve hastalıkları iyileştirmek için kullanılan ilaçların içindeki kimyasal maddeler bir kimyasal kirlilik havuzu oluşturmaktadır. Bu maddelerin bazıları organizmanın genetik yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmamakta ya da ortaya çıkan hasarlar DNA onarım enzimleri ile tamir edilebilmektedir. Ancak, bazıları gen mutasyonlarına, yapısal kromozom hatalarına veya rekombinasyonel değişimlere sebep olabilmektedir. Bu değişimler üreme hücrelerinde meydana geldiğinde, daha sonraki nesillere aktarılmaktadır. Somatik hücrelerde meydana geldiğinde ise, bireyin kendisinde çeşitli sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Bostancı, 2014).

DNA ile ve DNA ilişkili hücresel komponentler (ör: mitotik ve mayotik iğ iplikleri, replikasyon enzimleri, DNA onarım sistemi enzimleri, hücre döngüsünü kontrol eden proteinler, apoptozis ile ilişkili gen ürünleri, oksidatif hasara karşı savunma sağlayan proteinler) ile etkileşime giren veya genomda, kromozomlarda ya da genlerde hasarlara yol açan fiziksel ve kimyasal ajanlar genotoksik etkilidir. Genotoksisite; DNA, gen veya kromozom yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA zincir kırıkları, gen mutasyonları, yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. Genotoksik etkili ajanların hem bireyin kendisinde hem de gelecek nesillerinde neden olduğu genetik hasarlar, insanlarda ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Özellikle, genotoksisite ile kanser arasında kuvvetli bir ilişki olduğu ve insanlar için karsinojen olan ajanların % 90'ının genotoksik etkili olduğu bildirilmiştir (Kılıç 2005; Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011a).

İnsanların kullanımına sunulan kimyasal maddelerin sayısında gün geçtikçe artış gözlenmesi ve genotoksik etkili olanların önemli sağlık sorunlarına yol açtığı belirlenmesi, bu tip ajanların tespit edilmesini sağlayan kısa süreli genotoksisite testlerinin geliştirilmesine neden olmuştur (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007). Günümüzde bu testler; ilaçlar gibi insanların maruz kaldığı kimyasal maddelerin genotoksik potansiyellerinin tespitinde de yaygın kullanım alanı bulmuştur (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011). Yeni ilaç geliştirme sürecinde, insanlar üzerinde yapılan Faz I çalışmalarına başlamadan önce bu testler ile genotoksisite verileri değerlendirilmekte ve eğer genotoksisite yoksa klinik araştırma dönemi başlatılmaktadır. İlaç geliştirmenin preklinik döneminde aday ilaç molekülleriyle yapılması gereken genotoksisite testlerinin sonuçları, ilaçların deneysel koşullardaki etkililiğinden çok daha önemlidir (Demircigil, 2009).

Günümüzde, kısa süreli genotoksisite testlerinin kullanımı, ilaçlar gibi kimyasal maddelerin genotoksisite ve karsinojenite potansiyellerinin öngörülmesinde en akılcı yaklaşımdır. Tüm dünyanın geçerliliğini kabul ederek, rutin olarak kullandığı bu testlerin farklı hücre tipleri üzerinde yapılabilen 200'den fazla çeşidi vardır (Bajpayee, Pandey, Parmar & Dhawan, 2005; Bostancı, 2014; Doğan, Durusoy, Gökçe & Öztürk, 2014). Farklı uygulamalar olmakla beraber, bu testlerde model hücre olarak genellikle bakteriler ve lenfositler gibi memeli hücreleri kullanılmaktadır (Tarhan, 2006). Kısa süreli genotoksisite testleriyle ilgili genel kanı, genotoksik etkilerin tamamı

hakkında bilgi sağlayabilecek geçerlilikte bir testin olmadığı yönündedir. Çünkü, genotoksisite farklı mekanizmalarla oluşabilmekte ve farklı yöntemler ya da organizmalar kullanılarak yapılan testlerle farklı sonuçlar alınabilmektedir. Bu bakımdan, ilaçlar gibi kimyasalların genotoksik potansiyellerinin tek bir testle belirlenemeyeceği ve birbirini tamamlayan birkaç kısa zamanlı genotoksisite testinin bir arada kullanıldığı seri test sistemleriyle değerlendirilmesi önerilmektedir (Tarhan, 2006; Yırtıcı, 2007).

ICH'nin genotoksisite testlerine ilişkin ilk kılavuzu Mart 1994'de "S2A: Farmasotikler İçin Düzenleyici Genotoksisite Testlerinin Spesifik Yönlerine İlişkin Kılavuz" (ilaçlar hususundaki genotoksisite testleri konusunda belirlenmiş test protokollerini tanıtan) yayınlanmıştır. İkinci kılavuzu ise Ekim 1996'da "S2B: Genotoksisite: Farmasotiklerde Genotoksisite Testleri Hususunda Standart Test Serisi Kılavuzu" (genotoksisite test koşullarında uyumun sağlanması için test koşulları, test sonuçlarının yorumlanması ve bir terimler sözlüğünü içeren ek bir dökümanı içeren) yayınlanmıştır. Bu iki kılavuz, Mart 2008'de birleştirilerek "ICH S2(R1): İnsan Kullanımı İçin Tasarlanan Farmasotiklerde Genotoksisite Testleri ve Verilerin Yorumlanmasına İlişkin Kılavuz" başlığı altında revize edilmiştir. Kasım 2011'de ise son versiyonu hazırlanmıştır (Topaloğlu, 2014).

ICH kılavuzunda, ilaç üretiminde kullanılabilecek bir etken maddenin insanlar üzerinde kullanılmadan önce mutlaka standart test serisi kullanılarak genotoksik açıdan güvenliliğinin test edilmesi gerektiği bildirilmektedir. ICH kılavuzunda, standart test serisi olarak, aynı derecede uygun olduğu kabul edilen iki seçenek önerilmektedir. Birinci seçenekte: ilk basamakta, bakteriler üzerinde gerçekleştirilen bir gen mutasyon testi (ör: *Salmonella typhimurium* suşları ile AMES testi) yapılması önerilmektedir. İkinci basamakta, memeli hücrelerinde kromozomal hasarları belirleyebilen sitogenetik bir test (ör: *in vitro* kromozomal aberasyon testi veya *in vitro* mikronukleus testi) veya *in vitro* fare lenfoma timidin kinaz testi yapılması önerilmektedir. Son basamakta ise, bir *in vivo* genotoksisite testi, genellikle rodent hematopoietik hücreleri üzerinde kromozomal hasarı belirleyebilen bir test (ya mikronukleus testi ya da metafaz hücrelerinde kromozomal aberasyon testi) yapılması önerilmektedir. *In vivo* testlerle, organizmada metabolize edildikten sonra oluşabilen genotoksik ajanların belirlenmesi mümkün olmaktadır (ICH, 2011; Brambilla, Mattioli, Rbiano & Martelli, 2012).

ICH kılavuzunda, standart test serisi için kabul edilen ikinci seçenekte: birinci basamakta, bakteriler üzerinde gerçekleştirilen bir gen mutasyon testi yapılması önerilmektedir. İkinci basamakta, iki farklı doku ile yapılan *in vivo* genotoksisite değerlendirmesi, genellikle rodent hematopoietik hücreleri kullanılarak yapılan mikronukleus testi ve ikinci bir *in vivo* analiz (ör: karaciğerde DNA zincir kırığı analizi) yapılması önerilmektedir. Ayrıca bu kılavuzda, standartlara uygun olarak yapılan ve değerlendirilen üçlü seri test sistemi ile negatif sonuçlar veren kimyasal bileşiklerin genotoksik aktivitenin yokluğunu ispat etmek için yeterli düzeyde güvenilir oldukları belirtilmektedir. Standart seri testlerden biri veya daha fazlasıyla ile pozitif sonuç veren herhangi bir bileşiğin ise genotoksik olduğu ve risk değerlendirmesi için daha fazla test yapılması gerektiği belirtilmektedir. ICH kılavuzunda, standart üçlü test serisinin genişletilmesi ve modifiye edilmesi gereken durumların neler olduğu da bildirilmektedir (ICH, 2011). Diğer bir harmonizasyon örgütü olan OECD'nin "Kimyasalların Test Edilmesi Hususunda Test Kılavuzları" içerisinde, "4. Bölüm: Sağlık Etkileri" başlığı altında genotoksisite/mutajenite testlerinin uygulanması ve yorumlanması hakkında bilgiler yer almaktadır (OECD, 2015). En son 2015 yılında revize edilen OECD Genetik Toksikoloji Test Kılavuzunda yer alan genotoksisite testlerinin güncel durumu Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1.Genetik toksikoloji test kılavuzlarının güncel durumları (OECD, 2015)

TK	Başlık	Kabul edildi	Revize edildi	Silindi
	Yakın zamanda revize edilenler			
473	<i>In vitro</i> memeli kromozomal aberasyon testi	1983	1997/2014	
474	Memeli eritrosit mikronukleus testi	1983	1997/2014	
475	Memeli kemik iliği kromozomal aberasyon testi	1984	1997/2014	
476	Hprt veya xprt lokusunda <i>in vitro</i> memeli hücre gen mutasyon testi	1984	1997/2015	
478	Rodent dominant lethalite testi	1984	2015	
483	Memeli spermatogonial kromozom aberasyon testi	1997	2015	
	Yakın zamanda kabul edilenler			
487	<i>In vitro</i> memeli hücre mikronukleus testi	2010	2014	
488	Transgenik rodent somatik ve germ hücre gen mutasyon analizi	2011	2013	
489	<i>In vivo</i> memeli alkali comet analizi	2014		
490	Timidin kinaz lokusu <i>in vitro</i> gen mutasyon analizi	2015		
	Arşivlenenler/Silinenler			
472	Genetik toksikoloji: <i>Escherichia coli</i> , geri mutasyon analizi	1983		1997
477	<i>Drosophila melanogaster</i> 'de eşeye bağlı resesif lethal test	1984		2013
479	Memeli hücrelerinde <i>in vitro</i> kardeş kromatit değişimi analizi	1986		2013
480	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , gen mutasyon analizi	1986		2013
481	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mitotik rekombinasyon analizi	1986		2013
482	DNA hasarı ve onarımı, memeli hücrelerinde <i>in vitro</i> programlanmamış DNA sentezi	1986		2013
484	Fare spot test	1986		2013
	Muhafaza edilen, ancak revize edilmeyenler			
471	Bakteriyel geri mutasyon analizi	1983	1997	
485	Fare kalıtlabilir translokasyon analizi	1986		
486	Memeli hücrelerinde <i>in vivo</i> programlanmamış DNA sentezi (UDS)	1987		

TK (Test kılavuzu)

Bakteriyel Geri Mutasyon Analizi (AMES Testi)

Bakteriyel geri mutasyon analizi, nokta mutasyonlarını (ör: küçük insersiyonlardan ve delesyonlardan kaynaklanan baz çifti değişimleri ve çerçeve kayması mutasyonları) indükleyen kimyasal maddelerin tespit edilmesini sağlamaktadır. Bu testte, ya *Salmonella typhimurium* ya da *Escherichia coli* mutant suşları kullanılmaktadır. Bu suşlar, sırasıyla ya histidin ya da triptofan aminoasitleri biyosentez genlerinin operonlarının değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bu mutasyonlar, büyüme ortamında histidin veya triptofan aminoasitlerinin yokluğunda bakteriyel büyümeyi önlemektedir. Bu testin temeli, *S. typhimurium*'un histidin sentezleme ya da *E. coli*'nin triptofan sentezleme yeteneklerini mutasyon ile kaybetmiş suşlarının test maddesi ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidin'i veya triptofan'ı sentezleme özelliğini geri kazanması ve histidinsiz/triptofansız büyüme ortamında üreyebilmesi esasına dayanmaktadır. Histidinsiz ya da triptofansız besi ortamında üreyebilen koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir. *S. typhimurium* ve *E. coli* prokaryotik bakterilerdir ve hücresel işleyiş, metabolizma, kromozom yapısı ve DNA onarım prosesleri gibi faktörler açısından

ökaryotik/memeli hücrelerinden farklıdır. Bu nedenle, AMES testinin insanları da içeren memeli türlerindeki etkilerin yansıtılmasında bir miktar sınırlılıkları vardır (Oguz, Omurtag, Arıcıoğlu & Sardas, 2013; Yüzbaşıoğlu, Zengin & Ünal, 2014; OECD, 2015).

Kromozomal Aberasyon (KA) Testi

Kromozomal aberasyonlar, hasar görmüş kromozomların tamir edilememesinden, yanlış tamirinden ya da hücre bölünmesi esnasında kutuplara göçte oluşan anormalliklerden kaynaklanan ve kromozomlarda mikroskobik düzeyde gözlenebilen genetik değişikliklerdir. Bu anormallikler, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda uygulanabilen KA testi ile belirlenebilmektedir. *In vitro* KA testinde; kültüre edilmiş sperm, fibroblast, kemik iliği ya da sıklıkla periferik kan lenfositleri gibi memeli hücreleri kullanılır. *In vivo* KA testinde ise, genellikle kemik iliği hücreleri kullanılır. *In vitro* KA testinde, hücre kültürleri hasat edilmeden 2 saat önce; *in vivo* çalışmalarda ise hayvanlar kurban kurbanı edilmeden 2-4 saat önce bir tübülün polimerizasyon inhibitörü olan ve hücre bölünmesini metafaz safhasında durduran kolşisin uygulanır. Daha sonra, kültürlerden veya kemik iliği hücrelerinden elde edilen metafaz hücrelerinin kromozomlarında ortaya çıkan sayısal ve yapısal anormallikler tespit edilir (Bonassi ve ark, 1995; Norppa ve ark, 2006; Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011b; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz & Ünal, 2014).

Bilinen veya şüphelenilen genotoksik ajanlara, çevresel veya mesleki olarak maruziyet sonrası oluşan erken biyolojik etkinin gösterilmesinde en fazla kullanılan biyogösterge testlerinden biri olan KA, diğer biyogösterge testleri arasında altın standart olarak tanımlanmıştır. Çünkü kromozomal aberasyonun indüksiyon mekanizmaları çok iyi bilinmektedir. Ayrıca çoğu mutajen veya karsinojenin kromozomal aberasyonu indüklediği gösterilmiştir (Albertini, 2004). Tüm genomdaki hasarın izlenmesini mümkün kılan KA tekniği ile kanser riskinin erken dönemde belirlenmesi mümkündür (Hagmar ve ark, 1994; Bonassi ve ark, 1995; Bonassi ve ark, 2000; Au, 2007). İnsan popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar, periferik kan lenfositlerinde gözlenen kromozomal anormallik sıklığının, hem genotoksik karsinojenlere maruz kalmanın erken biyolojik etkilerini, hem de kansere bireysel duyarlılığı yansıttığını dolayısıyla insanlarda kanser riskiyle ilgili bir biyolojik gösterge olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmalar, periferik lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı olduğunu bildirmiştir (Yüzbaşıoğlu, Zengin & Ünal, 2014; Santovito, Cervella & Delpero, 2014, Ginzkey ve ark, 2014; Zemanova ve ark, 2014).

Mikronukleus (MN) Testi

Genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan mikronukleus testi, mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilmektedir. MN testi, *in vitro* çalışmalarda nukleer bölünme indeksinin, *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler (PKE) ile normokromatik eritrositler (NKE) arasındaki oran kullanılarak sitotoksisitenin tahmin edilmesini de sağlar (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011b). *In vitro* MN testinde, uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitozdan önce kültürün yaklaşık 44. saatinde küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan ve sitokinez için gerekli olan aktinin polimerizasyonunu inhibe eden sitokalesin B (Cyt-B) ilave edilir. Böylece, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak stoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli (binukleat) hücreler elde edilir. İnkübasyon süresi sonunda, hazırlanan preparatlarda binukleat hücrelerdeki MN'ler sayılır. *In vivo* MN testinde ise, sitokinezi bloke edilmemiş memeli eritrosit hücrelerindeki MN sıklığı belirlenir. Bu yöntemde genellikle kemik iliğindeki ve/veya periferik kan hücrelerindeki olgunlaşmamış (polikromatik) eritrositlerin MN oluşumu bakımından analizi yapılarak, test edilen bileşiğin genetik bir hasar oluşturup oluşturmadığı saptanır (Şekeroğlu & Şekeroğlu, 2011a).

Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, genotoksik ve/veya anojenik etkiler sonucu ortaya çıkmış asentrik elementler ve iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara gidemezler. Böylece hücre bölünmesi sonunda, aynı hücre sitoplazması içinde ana nukleusların yanında, onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özelliği gösteren küçük küresel yapılar

olarak gözlenirler. Bu yapılar anafaz evresinde geri kalan kromozomlar, asentrik kromozom fragmentleri veya yavru nukleusa girmeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşur. Anojenler, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromatid veya kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunurlar (Kirsch-Volders, 1997; Brambilla ve ark, 2012). Epidemiyolojik çalışmalar ve bazı kimyasalların genotoksisitenin araştırıldığı çalışmalar, insan periferik lenfositlerinde artmış MN frekansı ile kanser insidansı arasında önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Fenech ve ark, 1999; Bonassi ve ark, 2007; Parry & Kirsch-Volders, 2010; Preston, Skare & Aardema, 2010; Nersesyan ve ark, 2014).

Tek Hücre Jel Elektrofrez (Komet Analizi)

Tek hücre jel elektrofrez veya yaygın olarak kullanılan adı ile komet analizi, kimyasal veya fiziksel ajanların canlı hücreler üzerindeki genotoksik etkilerinin göstergesi olan DNA hasar oranının floresan mikroskop ile ölçülmesine dayanan bir metottur. İlk olarak, insan ve hayvan hücreleri üzerinde uygulanmıştır. Daha sonra bitkiler, bakteriler, funguslar üzerinde de denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu teknikte insan hücreleri olarak en sık, lökositler ve lenfositler kullanılmaktadır. Ancak nazal veya gastrik mukoza, lens, deri, kolon, fibroblast, pankreas, üreme ve adenokarsinom gibi insan hücreleri de kullanılabilir (Fidan, 2008; Dikilitaş & Koçyiğit, 2010). Tek bir hücredeki DNA zincir kırıklarının belirlenmesini sağlayan komet testi, DNA hasarının hücresel seviyede gözlenebilmesini sağlar. Ayrıca DNA tamir aktivitesinin, alkali şartlarda tayin edilebilen hasarların, çapraz bağlanmaların ve tamamlanamamış eksizyon tamir bölgelerinin tayinine de olanak sağlar (McCart ve ark, 2010; Sukumaran & Grant, 2013). Bu analizin ayrı amaçlara yönelik olan iki farklı uygulaması vardır (Rojas, Lopez & Valverde, 1999). Bu uygulamalardan biri, lizis ve elektrofrez aşamalarının nötral koşullar altında gerçekleştirildiği nötral komet tekniğidir. Bu teknikle sadece DNA çift sarmal kırıkları tayin edilebilmektedir. Diğer ise, lizis ve elektrofrez aşamalarının alkali koşullar altında gerçekleştirildiği alkali komet tekniğidir. Bu teknik ile çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıkları da tanımlanabilmektedir (Kassie, Parzefall & Knassmuller, 2000).

Günümüzde en çok kullanılan alkali komet tekniğinde ilk olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdekli hücreler mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içerisine gömülür. Daha sonra, bu lamlar yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis solüsyonunda bekletilir. Lizis solüsyonu, hücre ve çekirdek zarlarını eriterek, çekirdekteki süperkoil DNA'nın agaroz içinde serbest kalmasını sağlar. Lizis aşamasından sonra, sarmal yapıda olan DNA zincirlerinin çözülüp gevşemesi ve kırıkların ortaya çıkması için lamlar yüksek alkali özellikteki (pH>13) elektrofrez tampon çözeltisine daldırılır ve inkübasyona bırakılır. Inkübasyon tamamlandıktan sonra, DNA'lar bu tampon çözelti içerisindeki elektriksel alanda elektroforeze tabi tutulur. Elektrofrez takiben oluşan alkali ortamı nötrleştirmek ve lamlardan mikroskop altında net görüntü alınmasını sağlamak için, preparatlar nötralizasyon tamponu ile yıkanır. Nötralizasyon aşamasından sonra ise, DNA molekülleri etidyum bromür gibi DNA'ya spesifik boyalarla boyanıp, görüntüleri floresan mikroskop altında incelenir (Hartmann & Speit, 2009; Dikilitaş & Koçyiğit, 2010).

Boyanmış preparatların mikroskopik incelemesinde, DNA'lar içerdikleri hasarın derecesine göre, dairesel formdan kuyruklu yıldız benzer forma kadar değişen görüntüler oluştururlar. Hasarsız DNA'lar, elektrofrezde bütünlüklerini kaybetmeden anota doğru yürüdüklerinden dairesel şekilli görülürler. Genotoksik ajanlarla hasarlanmış, tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş ve tek veya çift zincirlerinde kırılmalar oluşmuş DNA'lar ise, farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektrofrezde anota doğru farklı hızlarda göç ettiklerinden kuyruklu yıldız şeklinde görüntüler oluştururlar. Yönteme İngilizcede "kuyruklu yıldız" anlamına gelen komet adının verilmesi bu sebeptendir. Karakteristik komet görüntülerinin analizi, floresan mikroskop üzerine monte edilen kapalı sistem dijital kamera bağlantısı ile yapılır. Bu analizler için, özel programlar kullanılır. Programlar, komet başını

kuyruktan ayırt edebilecek ve kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA yoğunluğu, kuyruk momenti gibi parametreleri belirleyebilecek şekilde tasarlanmıştır (Hartmann & Speit, 2009; Dikilitaş & Koçyigit, 2010).

Timidin Kinaz *Geni In Vitro* Gen Mutasyon Analizi

Bu analizde, L 5178Y fare lenfoma ve TK6 insan lenfoblastoid hücre serilerinin timidin kinaz (Tk) geni için heterozigot olanları (Tk^{+/+}) kullanılarak, Tk geninin ifadesini etkileyerek ileri mutasyonlara neden olan kimyasallar belirlenir. (Daha önceden gerçekleşen inaktive edici bir mutasyonu geri döndürmekten ziyade, gen ürününün fonksiyonunu inaktive eden mutasyonlara ileri mutasyon denir.) Bu analizde, uygulanan test kimyasalının etkisiyle Tk geninin fonksiyonunu kaybeden mutant hücreler (Tk^{-/-}), bir pirimidin analogu olan, hücresel metabolizmayı inhibe eden ve bir sonraki hücre bölünmesini durduran triflorotimidin (TFT)'in sitotoksik etkilerine direnç kazanır. Böylece, mutant hücreler TFT içeren üreme ortamında çoğalarak, mutant olmayan ve TFT'li ortamda çoğalamayan TK enzimi içeren heterozigotlar arasından seçilirler. Tk geninin, otozomal ve heterozigot doğası, Tk^{+/+}'dan Tk^{-/-}'ye mutasyonun ardından Tk enzimi olmayan hücrelerin tespit edilmesini sağlar. Bu eksiklik, Tk genini etkileyen gen mutasyonları (nokta mutasyonları, çerçeve kayması, küçük delesyonlar vb...) ve kromozomal olaylar (büyük delesyonlar, kromozomal yeniden düzenlenmeler ve mitotik rekombinasyon) gibi genetik olaylardan kaynaklanır (Clements, 2000; OECD TG 490, 2015; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz & Ünal, 2016).

Bu testte, süspansiyondaki veya tek tabakalı kültürdeki hücreler, hem metabolik aktivasyon varlığında hem de yokluğunda belli sürelerde ve dozlarda test maddesine maruz bırakılır. Sonrasında, sitotoksitenin belirlenmesi ve mutant seçiminden önce fenotipik ifadenin ortaya çıkması için alt kültürlerir. Sitotoksosite; fare lenfoma analizinde bağıl total büyümeyle, TK6 analizinde bağıl sağ kalımla belirlenir. Muameleli kültürler, indüklenen mutasyonların optimaile yakın fenotipik ifadesini sağlamak için yeterli bir zaman periyodunda büyüme ortamı içerisinde sürdürülür. Fenotipik ifadeyi takiben, seçici ajan içeren ortam içerisinde mutant frekansı belirlenir. Seçici ajan içermeyen ortam içerisinde bilinen sayıda hücre ekilerek, klonlanma verimliliği belirlenir. Mutant koloni sayısına dayanarak hesaplanan mutant frekansı, mutant seleksiyonu sırasındaki klonlanma verimliliği ile doğrulanır (OECD TG 490, 2015).

Tk gen mutasyon testinde, Tk mutantlarının iki farklı fenotipik sınıfı meydana gelir. Bunlar: Tk heterozigot hücreleri ile aynı hızda büyüyen normal büyüyen mutantlar ve uzamış ikilenme zamanında büyüyen yavaş büyüyen mutantlardır. Fare lenfoma analizinde, normal büyüyen ve yavaş büyüyen mutantlar, büyük koloni ve küçük koloni mutantları olarak tanınır. TK6 analizinde ise, erken beliren koloni ve geç beliren koloni mutantları olarak tanınır. Her iki hücre tipinde de, yavaş büyüyen mutantlar, Tk lokusunun yakınında bulunan ve büyümeyi düzenlediği düşünülen gen/genlerde genetik hasar içerir. Bu durum, uzamış ikilenme zamanına ve geç beliren veya küçük kolonilerin ortaya çıkmasına neden olur. Yavaş büyüyen mutantların indüklenmesi, kromozomal düzeyde büyük yapısal değişiklikleri indükleyen maddelerle ilişkilidir. İçerdikleri hasar Tk lokusunun yakınındaki büyümeyi düzenlediği düşünülen genleri içermeyen hücreler, atasal hücrelerle aynı hızlarda büyür ve normal büyüyen mutantlar oluşur. Normal büyüyen mutantların indüksiyonu, nokta mutasyonlarına neden olan maddelerle ilişkilidir. Sonuç olarak, hem yavaş büyüyen hem normal büyüyen mutantları sayılması, test kimyasalı tarafından indüklenen hasarın tipine dair bir bilgi sağlamak için gereklidir (OECD TG 490, 2015). Moleküler ve sitogenetik analizler, bu test ile pozitif sonuçlar elde edilen kimyasal maddelerin çoğunun memeli karsinogeni olduğunu göstermiştir. Ancak bu test ile negatif sonuçlar veren karsinogenler de vardır ve bu maddeler ya genotoksik olmayan mekanizmalarla ya da fare lenfoma hücrelerinde kolaylıkla tespit edilemeyen mekanizmalarla etki etmektedir. Dolayısıyla, bu test ile kanserojenlik arasında tam bir bağlantı yoktur (Moore ve ark, 2003).

Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) ve Ksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (XPRT) *In Vitro* Memeli Gen Mutasyon Analizleri

Bu analizlerle, pürin biyosentezi için gerekli Hprt ve Xprt enzimlerini kodlayan lokuslarda gen mutasyonları indükleyen maddeler tespit edilir. Bu testler, kullanılan hücre serilerindeki raportör genlerdeki (endojen hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (Hprt) geni ve ksantin guanin fosforibozil transferaz transgeni (gpt)) ileri mutasyonları belirler. HPRT testi, çok çeşitli hücre serileriyle yapılabilmektedir. En çok kullanılan hücreler: Çin hamster over (CHO), akciğer (CHL) ve akciğer fibroblast (V79) hücreleri, L5178Y fare lenfoma hücreleri ve TK6 insan lenfoblastoid hücreleridir. HPRT geninin otozomal olmayan lokasyonu nedeniyle, bu analizde tespit edilen mutasyon çeşitleri küçük insersiyon ve delesyonlardan kaynaklanan baz çifti değişimleri ve çerçeve kayması mutasyonlarını içeren nokta mutasyonlarıdır. HPRT geni, insanların ve rodentlerin sadece X kromozomu üzerinde bulunduğundan, her bir hücrede bu genin sadece bir kopyası aktiftir. Bu nedenle, sadece tek aktif HPRT lokusunda oluşan bir mutasyon bir hücre içerisinde fonksiyonel HPRT enziminin bulunmaması ile sonuçlanır (OECD TG 476, 1997; Albertini, 2001).

XPRT testinde, bakteriyel gpt transgeni içeren AS52 hücreleri kullanılır. Gpt transgeni, memelilerdeki HPRT proteininin analogu olan XPRT proteinini kodlar. Gpt lokusunun otozomal lokasyonu, X kromozomlarının üzerindeki hemizigot HPRT lokusunda kolay tespit edilemeyen büyük delesyonlar ve heterozigotluğun kaybı gibi belli genetik olayların tespit edilmesini sağlar. Sonuç olarak, HPRT ve XPRT mutasyon testleri genetik olayların farklı spektrumlarını ortaya çıkarır. XPRT, günümüzde düzenleyici amaçlar için HPRT testinden çok daha az kullanılır. HPRT testinde Hprt enzim aktivitesi veya XPRT testinde Xprt enzim aktivitesi olmayan mutant hücreler, bir pürin analogu ve metabolik bir zehir olan 6-thioguanin (6-TG)'in sitostatik etkilerine dirençlidir. Bu nedenle, test kimyasalının etkisiyle oluşan mutant hücreler 6-TG'li üreme ortamında çoğalabilirler Hprt (HPRT testinde) veya gpt (XPRT testinde) enzim aktivitesi olan hücreler ise, hücre metabolizmayı inhibe eden ve daha sonraki hücre bölünmelerini inhibe eden 6-TG'ye hassastır. Dolayısıyla, Hprt veya gpt enzim aktivitesi olan normal hücreler 6-TG'li üreme ortamında çoğalamaz (OECD TG 476, 1997).

Her iki testte de, süspansiyon içerisindeki veya tek tabakalı kültürlerdeki hücreler eksojen kaynaklı metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda uygun bir zaman periyodunda (3-6 saat) test kimyasalına maruz bırakılır. Sonrasında, sitotoksitenin belirlenmesi ve mutant seçiminden önce fenotipik ifadenin ortaya çıkması için alt kültürlenir. Sitotoksiste, bağlı sağ kalım ile belirlenir. (Ör: test maddesiyle muameleden sonra kültürlerin klonlanma verimliliği ölçülür ve muamele süresince olan hücre kaybı belirlenerek negatif kontrol ile karşılaştırılır.) Muameleli kültürler, indüklenen mutasyonların fenotipik ifadesinin optime yakın olmasını sağlamak için yeterli bir zaman periyodunda (umumiyetle en az 7-9 gün) büyüme ortamı içerisinde devam ettirilir. Fenotipik ifadeyi takiben, seçici ajan olan 6-TG içeren ortam içerisinde mutant frekansı belirlenir. Seçici ajan içermeyen ortama bilinen sayıda hücre ekilerek, klonlanma verimliliği (canlılığı sürdürme yeteneği) belirlenir. Uygun bir inkübasyon süresinden sonra koloniler sayılır. Mutant frekansı, seçici ortamdaki mutant kolonilerin sayısı ile seçici olmayan ortamdaki kolonilerin sayısından belirlenir. Mutant seleksiyonu ya petri kutularında (tek tabakalı kültür için) veya mikrotiter kültür plakalarında (süspansiyon hücre kültürleri için) gerçekleştirilir. HPRT veya XPRT içermeyen mutant hücreler, 6-TG'ye direnç göstermeleriyle seçilirler (OECD TG 476, 1998).

Rodent Dominant Letalite Testi

Rodent dominant letalite testi en sık fareler üzerinde yürütülür ancak sıçanlar da kullanılabilir. Bu testle erkek ebeveyn germ hücrelerinde veya fertilizasyon sonrası zigotta, dominant letal (DL) mutasyonları indükleyen maddeler tespit edilir. DL mutasyonlar, embriyonik veya fetal ölüme sebep olur. Bir test kimyasalına maruziyetin ardından bir DL mutasyonun indüksiyonu, kimyasalın test hayvanının germinal dokularını etkilediğini gösterir. DL mutasyonlar

genellikle kromozomal hasarın (yapısal ve sayısal anomaliler) sonucudur. Ancak, gen mutasyonları da bertaraf edilmemelidir (OECD, 2015; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz & Ünal, 2016). DL mutasyonu ya bir germ hücresinde oluşan veya erken dönemdeki embriyoya fertilizasyon sonrası fikse olmuş mutasyondur. Bu mutasyon, gamet disfonksiyonuna sebep olmaz ancak döllenmiş yumurta veya gelişen embriyo için letaldir. Eğer test kimyasalının ve onun metabolitlerinin erkek germ hücrelerine (ör: spermatogonial kök hücreleri ve/veya spermatogonia) ulaşamayacağına dair delil varsa, bu testi kullanmak uygun değildir (OECD TG 478, 2015).

Bu analizde genellikle erkek sıçanlar, test maddesiyle muamele edilir. Ancak, yumurtanın fertilizasyonunun ve embriyonik ölümün değerlendirileceği durumlarda dişi sıçanlar muamele edilir (OECD, 2015; Yüzbaşıoğlu, Yılmaz & Ünal, 2016). Kullanılan maruziyet ve çiftleştirme sistemi DL çalışmasının temel amacına bağlıdır. Testin başlangıcında, erkek hayvanlar test kimyasalına maruz bırakılır ve muamele edilmemiş, daha önce çiftleşmemiş dişilerle çiftleştirilir. Çiftleştirmenin ardından, dişilere uygun bir zaman periyodundan sonra ötenazi uygulanır ve implantlar ile canlı ve ölü embriyoların sayılarının belirlenmesi için uterusları incelenir. Muamele edilen gruptaki her bir dişideki canlı implantların, kontrol grubundaki her bir dişideki canlı implantlar ile karşılaştırılması ile test ajanının DL'si belirlenir. Muameleli gruptaki her bir dişideki ölü implantlardaki artışın, kontrol grubundaki her bir dişideki ölü implantlardan fazla olması test maddesinin implantasyon sonrası kaybı uyardığını yansıtır. İmplantasyon sonrası kayıp; muameleli gruptaki total implant içerisindeki ölü oranının, kontrol grubundaki total implant içerisindeki ölü oranı ile karşılaştırılmasıyla hesaplanır. İmplantasyon öncesi kayıp, corpus luteumların sayısından veya muamele ve kontrol gruplarındaki her bir dişideki total implantlar karşılaştırılarak hesaplanır. Total dominant letal etki, preimplantasyonel veya postimplantasyonel kaybın toplamıdır. Total dominant letal etkinin hesaplanması, test grubundaki her bir dişideki canlı implantlar ile kontrol gruplarındaki her bir dişideki canlı implantların karşılaştırılmasına dayanır. Belirli aralıklarda implant sayısındaki azalma hücre ölümünün (ör: spermatosit ve/veya spermatogonyum) sonucu olabilir (OECD TG 478, 2015).

Memeli Karaciğer Hücrelerinde *In Vivo* Programlanmamış DNA Sentezi Testi

Bu testin amacı, kimyasallarla muamele edilen hayvanların genellikle de sıçanların karaciğer hücrelerinde DNA onarımını indükleyen maddeleri tespit etmektir. Kimyasalların karaciğerdeki genotoksik etkilerinin araştırılmasını sağlayan *in vivo* bir metottur. Bu analizle belirlenen sonuç, karaciğer hücrelerindeki DNA hasarı ve bunu takiben gerçekleşen onarımın göstergesidir. Karaciğer absorbe edilen bileşiklerin metabolize edildiği ve atılıma uğradığı başlıca organdır. Bunun sonucu olarak karaciğer hücreleri; karaciğer fonksiyon bozukluğu, hücrel hasar ve daha ileri durumlarda organ yetmezliğine yol açabilecek şekilde bu kimyasallara yüksek oranda maruz kalır. Bu nedenle, *in vivo* DNA hasarını ölçmek için en uygun bölgedir. Eğer test maddesinin hedef dokuya ulaşamayacağına dair delil varsa, bu testi kullanmak uygun değildir. Özellikle karaciğeri hedef alan ve metabolik aktivasyon varlığında AMES testi ile pozitif sonuçlar veren maddelere maruziyet sonrası oluşan DNA hasarını tespit etmek için uygun bir testtir. Bu test, sadece nükleotid kesip-çıkarma (eksizyon) tamir mekanizması ile onarılan DNA hasar tipini indükleyen kimyasal maddelere pozitif yanıt verir (OECD TG 486, 1997).

Bu testte, hayvanlar önce test maddeleri ile uygun yolla muamele edilir. Daha sonra, hayvanların karaciğer hücrelerinin kısa süreli kültürleri genellikle karaciğerin kollajenazla *in situ* perfüzyonuyla elde edilir ve kültüre alınır. İzole edilen memeli karaciğer hücreleri genellikle tirityum işaretli timidin (^3H -TdR) içeren bir ortamda 3-8 saat gibi uygun bir zaman uzunluğunda inkübe edilir. Böylece ^3H -TdR'nin eksizyon sonrası onarım sentezi yolu ile karaciğer hücre DNA'sına dahil olması *in vitro* olarak yapılmış olur. ^3H -TdR alımı genellikle otoradyografiyle belirlenir (OECD TG 486, 1997; OECD, 2015).

Test sonucunda bir pozitif cevabının tespit edilmesi, hasarlı bölgede çıkarılan ve yer değiştiren DNA bazlarının sayısına bağlıdır. Dolayısıyla bu analiz, test maddesiyle indüklenen uzun yama onarımının (20–30 baz) belirlenmesinde çok değerlidir. Tersine, kısa yama onarımı (1–

3 baz) çok daha az duyarlılıkla belirlenir. Ayrıca, mutajenik olaylar DNA hasarlarının onarılmamasından, yanlış onarılmasından veya yanlış replikasyonundan kaynaklanabilir. Pozitif cevabın derecesi, onarım proseslerinin doğruluğu hakkında herhangi bir bilgi vermez. Diğer yandan, mutajenin DNA ile etkileşime girmesi ancak DNA hasarının eksizyon onarım işlemiyle onarılmaması da mümkündür. UDS testiyle elde edilen mutajenik etkinlik ile ilgili spesifik bilgi eksikliği, ulaşılan sonucun potansiyel duyarlılığının belirlenebilmesiyle telafi edilir, çünkü bu tüm genom içinde ölçülmüştür (OECD TG 486, 1997).

SONUÇ

İlaç endüstrisinde, yeni ilaçların geliştirilme sürecinin önemli bir kısmını oluşturan toksikolojik araştırmalar, kullanıma sunulacak ilaç etken maddelerinin etkililikleri ile güvenlilikleri arasındaki dengenin kurulmasını sağlar. Ayrıca bu araştırmalar sonucunda, yeni ilaçlarla ilgili yarar-zarar, güvenlilik-toksisite, en yüksek tolere edilebilen doz-toksik olmayan etkili doz, LD₅₀-ED₅₀ ile ilgili soruların cevapları deney hayvanları, izole organlar veya *in vitro* koşullarda hücre kültürleri üzerinde belirlenmiş olur. Toksikolojik araştırmaların aşamalarından biri olan özel toksisite çalışmalarında, ilaç etken maddelerinin karsinojenik, immunotoksik, nörotoksik, teratojenik ve genotoksik etkileri araştırılır. Preklinik dönemde yapılan genotoksik etki araştırmalarında, ilaç adayı moleküllerin genetik materyal üzerinde değişiklik oluşturup oluşturmadığı değerlendirilir. İlaç etken maddeleri olarak önerilmesi düşünülen moleküllerin insanların kullanımına sunulmadan önce genotoksisite testleri gibi güvenlilik testlerinden geçirilmesi ilaç geliştirme sürecinin çok önemli bir aşamasıdır (Şen, 2018).

Toplanması yıllarca süren ve elde edilmesi çok maliyetli olan aday ilaçlara ait genotoksisite verilerinin, farklı ülkelerin düzenleyici otoriteleri tarafından değişik formatlarda ve standartlarda istenmesi yeni ilaçların piyasaya çıkmasını geciktirmekte ve araştırmalarda gereksiz yere deney materyali kullanımına neden olmaktadır. Bu nedenle, bu verileri elde etmek için kullanılacak genotoksisite testlerinin prosedürleri, temel prensipleri ve yorumlanması hususunda dünya genelinde ortak bir stratejinin izlenmesini sağlamak amacıyla ICH ve OECD gibi harmonizasyon örgütleri kılavuzlar yayınlamıştır. Bu kılavuzlar, üye ülkeler için bağlayıcı olsa da, üye ülkelere ilaç ihraç edebilmek ve uluslararası ilaç araştırmalarında daha çok yer alabilmek için bu kılavuzlardan haberdar olmak ve bunlara uyum sağlamak gerekmektedir (Topaloğlu, 2014).

KAYNAKLAR

- Albertini, R. J. (2001). HPRT mutations in humans: biomarkers for mechanistic studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 489(1), 1-16.
- Albertini, R. J. (2004). Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen. *LARC Scientific Publications*, 157, 153-177.
- Arodola OA, Soliman MES. (2017). Quantum mechanics implementation in drug-design work-flows: does it really help? *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 2551-2564.
- Au, W. W. (2007). Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer. *International Journal of Hygiene Environmental Health*, 210(3), 239-246.
- Bajpayee, M., Pandey A. K., Parmar, D., Dhawan, A. (2005). Current status of short-term tests for evaluation of genotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity of environmental chemicals and NCEs. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 15(3), 155-180.
- Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Prá, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., .. & Sbrana, I. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer genetics and cytogenetics*, 79(2), 133-135.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Strömberg, U., Montagud, A. H., Tinnerberg, H., Forni, A., .. & Knudsen, L. E. (2000). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. *Cancer Research*, 60(6), 1619-1625.

- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., ... & Bigatti, M. P. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631.
- Bostancı, Ş. Ö. (2014). Bazı benzotiyazol türevi bileşiklerin mutajenik potansiyellerinin ames test sistemi ile belirlenmesi, H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Brambilla, G., Mattioli, F., Rbiano, L., Martelli, A. (2012). Update carcinogenicity studies in animals and humans of 535 marketed pharmaceuticals. *Mutation Research*. 750(1), 1-51.
- Brummelan, P. V. (2007). İlaç geliştirilmesi. Türk Eczacılar Birliği Yayını. İlaç yararları ve riskleri, farmakolojiye giriş. 113-127 (Cited: 23.05.2018, Available at: http://e-kutuphane.teb.org.tr/pdf/raporlar/ilac_risk/11.pdf).
- Cardoso, R. S., Takahashi-Hyodo, S., Peitl, P., Ghilardi-Neto, T., & Sakamoto-Hojo, E. T. (2001). Evaluation of chromosomal aberrations, micronuclei, and sister chromatid exchanges in hospital workers chronically exposed to ionizing radiation. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis*, 21(6), 431-439.
- Ciociola, A. A., Cohen, L. B., Kulkarni, P., Kefalas, C., Buchman, A., Burke, C., ... & Fass, R. (2014). How drugs are developed and approved by the FDA: current process and future directions. *The American journal of gastroenterology*, 109(5), 620.
- Clements, J. (2000). The mouse lymphoma assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 97-110.
- Dabrowska, A., Thaul, S. (2018). How FDA approves drugs and regulates their safety and effectiveness. Congressional Research Service Report. (Cited: 15.07.2018 Available at: <file:///C:/Users/LENOVO-PC/Desktop/Dabrowska%20A%20Thaul%20S%202018.pdf>)
- Demircigil, G. C., Emerce, E., & Ulutas, O. K. (2009). Genotoxicity tests from biomarker studies to the regulations: National perspective. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4), 217.
- Dikilitaş, M., Koçyigit, A. (2010). Canlılarda tek hücre jel elektroforez yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2), 77- 89.
- Doğan, T. S., Durusoy, M., Gökçe, M., Öztürk, K. (2014). Genotoxicity of potent antiviral 1-[(2-aminophenyl)thio]- 1-phenyl-2-nitrobutane derivatives designed as drug agents. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39(3), 328-335.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E., & Bonassi, S. (1999). The human micronucleus project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1), 271-283.
- Fidan, A. F. (2008). DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *AKÜ-Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52.
- Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., Burghartz, M., Scherzed, A., Hackenberg, S., ... & Kleinsasser, N. H. (2014). Nicotine derived genotoxic effects in human primary parotid gland cells as assessed in vitro by comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and chromosome aberrations test. *Toxicology in vitro*, 28(5), 838-846.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H., & Reuterwall, C. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer research* 58(18), 4117-4121.
- Hagmar, L., Brøgger, A., Hansteen, I. L., Heim, S., Högstadt, B., Knudsen, L., ... & Reuterwall, C. (1994). Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer research*, 54(11), 2919-2922.
- Hartmann, A., Speit, G. (2009). Comet Assay – Protocols and Testing Strategies Chapter 15. In: The Comet Assay in Toxicology. Eds: Dhawan A, Anderson D, The Royal Society of Chemistry Publishing, UK.
- ICH, (2011). ICH harmonised tripartite guideline, Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. S2(R1), Current step 4 version.
- İskit, A. B. (2006). Bir ilaç yaratmak. Klinik (ilaç) araştırma dönemleri. *İKU Dergisi*, 13, 10-13.
- Jena, G. B., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2002). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian journal of pharmacology*, 34(2), 86-99.
- Kassie, F., Parzefall, W., & Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(1), 13-31.

- Şen, S., Beceren, A., & Aksoy, H. (2018). Genotoksisite testlerinin yeni ilaç geliştirme sürecindeki önemi. *Journal of Human Sciences*, 15(3), 1634-1649. doi:[10.14687/jhs.v15i3.5400](https://doi.org/10.14687/jhs.v15i3.5400)
- Kılıç, A. (2005). Bitkisel kaynaklı bazı uçucu yağ ve monoterpenlerin olası genotoksik etkilerinin araştırılması. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1), 1-4.
- McArt, D. G., McKerr, G., Saetzler, K., Howard, C. V., Downes, C. S., & Wasson, G. R. (2010). Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages. *Mutagenesis*, 25(3), 299-303.
- Moore, M. M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., ... & Kirchner, S. (2003). Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup report—Plymouth, UK 2002. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(2), 127-140.
- Nersesyan, A., Kundi, M., Fenech, M., Bolognesi, C., Misik, M., Wultsch, G., ... & Knasmueller, S. (2014). Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 762, 37-51.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., ... & Cebulski-Wasilewska, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1), 37-45.
- OECD TG 490. Guideline for the testing of chemicals, in vitro mammalian cell gen mutation tests using the thymidine kinase gene. (Cited: 23.05.2018 Available at: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264242241-en>)
- OECD TG 476. In vitro mammalian cell gen mutation tests using the Hprt and Xprt genes. Guideline for the testing of chemicals. (Cited: 23.05.2018 Available at: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071322-en>)
- OECD TG 478. Rodent dominant lethal assay. Guideline for the testing of chemicals. (Cited: 23.05.2018 Available at: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264243118-en>)
- OECD TG 486. Unscheduled DNA synthesis assay. Guideline for the testing of chemicals. (Cited: 23.05.2018 Available at: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071520-en>)
- OECD Genetic Toxicology Guidance Document: Second Commenting Round. (2015). (Cited: 23.05.2018) Available at: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071520-en>
- Oguz, S., Omurtag, G. Z., Arıcıoğlu, F., Sardas, S. (2013). Mutajenik-karsinojenik etkinin ames testi ile araştırılması. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 75-82.
- Parry, J. M., & Kirsch-Volders, M. (2010). Special issue on in vitro MN trial. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 702(2), 132-134.
- Preston, R. J., Skare, J. A., & Aardema, M. J. (2009). A review of biomonitoring studies measuring genotoxicity in humans exposed to hair dyes. *Mutagenesis*, 25(1), 17-23.
- Rojas, E., Lopez, M. C., & Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1-2), 225-254.
- Santovito, A., Cervella, P., & Delpero, M. (2014). Increased frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of radiology technicians chronically exposed to low levels of ionizing radiations. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(1), 396-403.
- Sukumaran, S., & Grant, A. (2013). Differential responses of sexual and asexual artemia to genotoxicity by a reference mutagen: Is the comet assay a reliable predictor of population level responses?. *Ecotoxicology and environmental safety*, 91, 110-116
- Şekeroğlu, Z. A., Şekeroğlu, V. (2011a). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z. A. (2011b) Genetik hasarın belirlenmesinde mikronukleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2011; 68(4): 241-252.
- Şen, S. Karbonik anhidraz inhibitörü metilenaminobenzen sülfonamid türevlerinin genotoksik profillerinin belirlenmesi. SAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2018.
- Tarhan, G. H. (2006). Antidepresan olarak kullanılan Paxil ve Prozac ilaçlarının insan lenfosit kültürlerindeki genotoksik etkileri. G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
- Thybaud, V., Delrue, N., Douglas, G. R., Lorge, E., Lovell, D. P., Moore, M. M., ... & Singer, T. (2014). Revision of Oecd guidelines for genotoxicity: current status and next steps. *Mutagenesis*, 29(6), 517.

- Topaloğlu, H. (2014). International conference on harmonisation (ICH) nedir? Ne değildir? *İKU Dergisi*, 6, 7-11.
- Williams, C. T. (2016). Food and Drug Administration Drug Approval Process: A History and Overview. *Nursing Clinics of North America*, 51(1), 1-11.
- Yırtıcı, Ü. (2007). Tartrazinin *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin mikronukleus yöntemi ile araştırılması. ERÜ. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *GIDA*, 39(3), 179-186.
- Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, E.A., Ünal, F. (2016) Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 9(1), 17-28.
- Zemanova, Z., Michalova, K., Buryova, H., Brezinova, J., Kostylkova, K., Bystricka, D., ... & Ransdorfova, S. (2014). Involvement of deleted chromosome 5 in complex chromosomal aberrations in newly diagnosed myelodysplastic syndromes (MDS) is correlated with extremely adverse prognosis. *Leukemia research*, 38(5), 537-544.

Extended English Summary

Nowadays, there is a great need for improvement of variants of clinically available drugs that have proved treating effects or reduced side effects. Furthermore, the development of effective drugs that can be used for diseases having no definite treatment yet such as cancer and new antimicrobials are needed. In accordance with these requirements, the number of studies on improving new drugs continues to increase around the world. Determining that newly developed drugs have significant biological activities is not enough to recommend them for human consumption. In chemotherapy, it is essential to treat patients without creating health risks and the safety of drugs is more important than their activities. In this respect, chemical substances that are intended to be offered as drugs are subjected to extensive toxicological researches that act as safety tests before they are administered to humans. Obtaining the biological information that confirms toxicity is the most important goal of drug safety assessment. Toxicological researches, which are an important part of the drug development process, help establish the balance between the safety and efficiency of the active substances in drugs to be offered for consumption.

In specific toxicity studies, a stage within toxicological researches, the focus is investigating the carcinogenic, immunotoxic, neurotoxic, teratogenic and genotoxic effects of the active substances in drugs. In genotoxicity studies, during a stage of toxicological researches, possible damage of candidate drugs on genetic material is evaluated. For this purpose, short-term genotoxicity tests which can be administered *in vivo* or *in vitro* conditions are used. Genotoxicity research at the beginning of the drug improvement process is very important, as DNA damages caused by genotoxic agents can cause serious health problems in humans such as birth defects, cancer, infertility, cardiovascular, immune system and degenerative diseases. For this reason, in drug development process before starting phase I studies carried out on human, genotoxicity data are evaluated using a short-term test. If genotoxicity does not exist, a clinical trial period is initiated.

At the present day, the most reasonable approach to anticipating the genotoxic potentials of chemical substances (e.g., drugs) is to use short-term genotoxicity tests. The general opinion about these tests, accepted and used frequently by researchers around the world, is that none of them are solely valid enough to provide information about each and every genotoxic effect. This results from the fact that genotoxicity can be created by a variety of mechanisms, and the tests that are conducted with different methods or organisms may provide different results. In this regard, it is recommended that the genotoxic potential of chemical substances should be assessed by a standart battery system that use a number of short-term genotoxicity tests together.

The genotoxicity data of drugs obtained from these trials is requested as a part of the security evaluation process of regulatory authorities of different countries. The request for this information, which brings about ample cost and effort to obtain, by regulatory authorities of different countries

in different formats and standards prevents the marketing of potential drug candidates, disrupts the drug development process, and causes unnecessary use of experiment materials in studies. Accordingly, it is of general acceptance that the studies aiming to obtain this information today be conducted using the standardized approaches in the guides of international harmonization organizations (e.g., ICH [The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use] and OECD [Organization for Economic Co-operation and Development]).

ICH was established with the participation of the regulatory authorities in the United States (US), the European Union (EU) and Japan in addition to pharmaceutical industry foundations; it published several guides that were harmonized and categorized into four main groups that are quality, safety, effectiveness, and multidisciplinary. These guides are about the approach that should be used in drug development process. The heading of security also involves the guides about genotoxicity tests. OECD is another international harmonization organization, and consists of 31 countries including Turkey. It published guides on standardized toxicological test methods that can be used to determine the effects of chemical substances (e.g., drugs) on human health. Section 4, entitled “Health Effects”, of Test Guides for Testing of Chemicals by the OECD contains information about the administration and interpretation of genotoxicity/mutagenicity tests. Even though, these guidelines are binding for member states, it is necessary to be aware of and to conform to these guidelines in order to be more involved in international drug studies and to export drugs to member countries. This review was intended to provide current information about the genotoxicity tests that are used in drug development process with reference to ICH and OECD guides as well as the relevant literature.